



IFW

<b>FEE TRANSMITTAL</b> <b>For FY 2006</b>		<b>Complete if Known</b>		
		Application Number	10/567,439	
		Filing Date	February 7, 2006	
		First Named Inventor	Daijie Chen	
		Examiner Name	To be assigned	
<input type="checkbox"/> Applicant claims small entity status. See 37 CFR 1.27	Art Unit	To be assigned		
TOTAL AMOUNT OF PAYMENT	(\$)	0.00	Attorney Docket No.	37137-227749

**METHOD OF PAYMENT** (check all that apply)

☐ Check    ☐ Credit Card    ☐ Money Order    ☒ None    ☐ Other (please identify): \_\_\_\_\_

☐ Deposit Account    Deposit Account Number: 22-0261    Deposit Account Name: Venable LLP

For the above-identified deposit account, the Director is hereby authorized to: (check all that apply)

☐ Charge fee(s) indicated below    ☐ Charge fee(s) indicated below, except for the filing fee

☒ Charge any additional fee(s) or underpayment of fee(s) under 37 CFR 1.16 and 1.17    ☒ Credit any overpayments

**FEE CALCULATION (All the fees below are due upon filing or may be subject to a surcharge.)**

**1. BASIC FILING, SEARCH, AND EXAMINATION FEES**

Application Type	FILING FEES		SEARCH FEES		EXAMINATION FEES		Fees Paid (\$)
	Fee (\$)	Small Entity Fee (\$)	Fee (\$)	Small Entity Fee (\$)	Fee (\$)	Small Entity Fee (\$)	
Utility	300	150	500	250	200	100	
Design	200	100	100	50	130	65	
Plant	200	100	300	150	160	80	
Reissue	300	150	500	250	600	300	
Provisional	200	100	0	0	0	0	

**2. EXCESS CLAIM FEES**

Fee Description	Small Entity	
	Fee (\$)	Fee (\$)
Each claim over 20 (including Reissues)	50	25
Each independent claim over 3 (including Reissues)	200	100
Multiple dependent claims	360	180

**Total Claims**    **Extra Claims**    **Fee (\$)**    **Fee Paid (\$)**    **Multiple Dependent Claims**

\_\_\_\_\_ - 20 = \_\_\_\_\_ x \_\_\_\_\_ = \_\_\_\_\_    **Fee (\$)**    **Fee Paid (\$)**

HP = highest number of total claims paid for, if greater than 20.

**Indep. Claims**    **Extra Claims**    **Fee (\$)**    **Fee Paid (\$)**

\_\_\_\_\_ - 3 = \_\_\_\_\_ x \_\_\_\_\_ = \_\_\_\_\_

HP = highest number of independent claims paid for, if greater than 3.

**3. APPLICATION SIZE FEE**

If the specification and drawings exceed 100 sheets of paper (excluding electronically filed sequence or computer listings under 37 CFR 1.52(e)), the application size fee due is \$250 (\$125 for small entity) for each additional 50 sheets or fraction thereof. See 35 U.S.C. 41(a)(1)(G) and 37 CFR 1.16(s).

Total Sheets	Extra Sheets	Number of each additional 50 or fraction thereof	Fee (\$)	Fee Paid (\$)
_____	_____	_____ / 50 _____ (round up to a whole number) x _____	_____	_____

**4. OTHER FEE(S)**

Non-English Specification, \$130 fee (no small entity discount)

Other (e.g., late filing surcharge): \_\_\_\_\_

<b>SUBMITTED BY</b>			
Signature		Registration No. (Attorney/Agent)	57,400
Name (Print/Type)	Manni Li	Telephone	(202) 344-8119
		Date	August 21, 2006





IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:  
Chen et al.

Art Unit: To be assigned

Application No: 10/567,439

Examiner: To be assigned

Confirmation No: To be assigned

Filed: February 7, 2006

Atty. Docket No: 37137-227749

For: USE OF CLOUD POINT SYSTEM IN  
BIOTRANSFORMATION

Customer No:

**26694**

PATENT TRADEMARK OFFICE

**CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicants hereby claim priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
China	03142114.8	August 7, 2003

In support of this claim, a certified copy of the said original foreign application is filed herewith.

Dated: Aug. 21. 2006

Respectfully submitted,

By Manni Li  
Manni Li

Registration No.: 57,400  
VENABLE LLP  
P.O. Box 34385  
Washington, DC 20043-9998  
(202) 344-4000  
(202) 344-8300 (Fax)  
Attorney/Agent For Applicant



中华人民共和国国家知识产权局  
STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE  
OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA



# 证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日: 2003.08.07  
申 请 号: 03142114.8  
申 请 类 别: 发明  
发明创造名称: 浊点系统在生物转化中的应用

申 请 人: 上海来益生物药物研究开发中心有限责任公司

发明人或设计人: 王志龙、陈代杰、戈梅、金一平、叶伟东



CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

中华人民共和国  
国家知识产权局局长

田 力 普

2006 年 4 月 10 日



## 权 利 要 求 书

1. 一种浊点系统在生物转化中的应用方法，其特征在于该方法采用一种或一种以上非离子表面活性剂形成浊点低于微生物转化培养温度的水溶液系统，作为微生物转化的介质。
2. 根据权利要求 1 所述的浊点系统在生物转化中的应用方法，其特征在于其中所述的非离子表面活性剂为聚氧乙烯醇类、聚氧乙烯醚类或辛基酚聚氧乙烯类表面活性剂。
3. 根据权利要求 2 所述的浊点系统在生物转化中的应用方法，其特征在于其中所述的聚氧乙烯醇类包括 Brij30, Brij35, Fluka, Brij56 或 C<sub>12</sub>E<sub>7</sub>; 聚氧乙烯醚类包括 Tween20、Tween40、Tween60、Tween80、Span20、Span40、Span60 或 Span80; 辛基酚聚氧乙烯类包括 Triton X-100 或 Triton X-114。
4. 根据权利要求 1 所述的浊点系统在生物转化中的应用方法，其特征在于其中所述的微生物转化是指疏水性化合物的微生物转化，或底、产物抑制微生物生长，或产物被微生物进一步降解。



## 浊点系统在生物转化中的应用

### 技术领域

本发明属于微生物技术领域。具体涉及浊点系统在生物转化中的应用。

### 背景技术

微生物转化疏水性化合物常受到一些因素的严重制约：底物在水中的溶解度很小，限制了其生物利用度和产物/底物对微生物的抑制和毒害作用。这些问题在生物降解有毒污染物时也经常遇到。介质工程就是在转化介质中加入具有生物相容性但本身不生物降解的组分以减轻或排除这些限制。因而有机溶剂两相系统、双水相系统、脂质体系统、胶束系统、油包水型微观乳浊液或反胶束系统等新型介质系统不断引入。

非离子表面活性剂胶束溶液，在温度高于其浊点或有诱导物存在的条件下，会自动分相形成表面活性剂稀相和富含表面活性剂的凝聚层相，常称为浊点系统（cloud point system, CPS）。浊点系统在分离技术中的应用已有多年。这一相系统具有易于控制、放大可靠、操作简单等优点而倍受青睐。尤其，该“系统”具有含水率高、条件温和的优点，不会损害引入的细胞和蛋白质等生物物质而受到生物分离工作者的重视。CPS 应该具有较好的生物相容性。底物、产物可在两相中实现不同的分配，基于两相系统的微生物转化可能排除潜在的产物、底物抑制或毒害。另外，如果产物和细胞能在不同相中分配就可通过萃取分离细胞以替代常规的机械分离。表面活性剂胶束溶液具有增溶作用，能显著地增加疏水性物质的表观溶解度，由此增强其生物利用度，刺激微生物转化。尽管可能有如此多优点，但浊点系统作为转化介质还未见文献报道。



## 发明内容

本发明所要解决的技术问题在于设计浊点系统的新应用。

本发明提供了浊点系统在生物转化中的新应用，即采用一种或一种以上非离子表面活性剂形成浊点低于微生物转化培养温度的水溶液系统即浊点系统，作为微生物转化的介质。

本发明所述的非离子表面活性剂选自聚氧乙烯醇类、聚氧乙烯醚类或辛基酚聚氧乙烯类表面活性剂。

其中所述的聚氧乙烯醇类包括 Brij30, Brij35, Brij56 或 C12E7; 聚氧乙烯醚类包括 Tween20、Tween40、Tween60、Tween80、Span20、Span40、Span60 或 Span80; 辛基酚聚氧乙烯类包括 Triton X-100 或 Triton X-114。

本发明公开的浊点系统特别适用于：

1. 疏水性化合物的微生物转化;
2. 底物、产物抑制微生物生长;
3. 产物被微生物进一步降解;

如胆固醇边链的切除、甾体化合物转化、有机污染沉淀物的降解等。

本发明以胆固醇的微生物边链切除为模型，进一步说明筛选适当的浊点系统作为介质工程的新方法。

胆固醇经微生物边链切除生成甾体药物的重要中间体 ADD 是生物转化疏水性化合物的典型例子。首先，胆固醇是典型的疏水性化合物，其在水中的溶解度常在  $1\mu\text{M}$  以下，而一般的甾体在  $0.01\sim 0.1\text{mM}$  之间。其次，这一转化的底物和产物对微生物都有毒害作用。

该转化方法设计包括下列步骤：

### (1) 选择表面活性剂

表 1 非离子表面活性剂的基本性质

非离子表面活性剂	结构通式*	疏水基团	CMC (mM)	HLB	CP ( $^{\circ}\text{C}$ )
聚氧乙烯醇 Brij 30	$\text{C}_{12}\text{E}_4$	十二(烷)醇	0.02-0.06	9.5	4



	$C_{12}E_7$	十二(烷)醇	0.07	12.5	65
Brij 35	$C_{12}E_{23}$	十二(烷)醇	0.09	16.9	>100
Brij 56	$C_{16}E_{10}$	鲸脂		12.9	64-69
聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯					
Span 20	$C_{12}S_6$	十二(烷)酸		8.6	
Span 40	$C_{16}S_6$	十六(烷)酸		6.7	
Span 60	$C_{18}S_6$	十八酸		4.7	
Span 80	$C_{18}S_6$	十八烯酸		4.3	
Tween 20	$C_{12}S_6E_{20}$	十二(烷)酸	0.04-0.06	16.7	
Tween 40	$C_{16}S_6E_{20}$	十六(烷)酸	29 <sup>a</sup>	15.6	
Tween 60	$C_{18}S_6E_{20}$	十八酸	27 <sup>a</sup>	14.9	
Tween 80	$C_{18}S_6E_{20}$	十八烯酸	0.01-0.02	15	
乙醇酐乙氧基化物					
Triton X-100	$C_8\Phi E_{9-10}$	辛基苯酚	0.2	13.5	64
Triton X-114	$C_8\Phi E_{7-8}$	辛基苯酚	0.3	12.8	22

\*:  $S_6$  表示山梨聚糖环;  $E_n$  表示乙撑氧基团的数量;  $C_n$  表示烃基链中的碳原子数;  $\Phi$  表示酚环. <sup>a</sup> 表示 mg/L.

选择了三类非离子表面活性剂中的 14 种表面活性剂进行筛选。其基本性质如表 1 所示。聚氧乙烯醇 (Brij 30, Brij 35, Fluka; Brij56,  $C_{12}E_7$ , 上海助剂厂)。聚氧乙烯醚 (Tween20, Tween40, Tween60, Tween80, Span20, Span40, Span60, Span80, 上海试剂有限公司)。辛基酚聚氧乙烯 (Triton X-100, 上海试剂有限公司; Triton X-114, Fluka)。

## (2) 微生物转化

微生物菌种 *Mycobacterium* sp. NRRL B 3683。它能实现胆固醇的变链切除, 生成产物 ADD 和 4-AD, 其比例为 10:1。

### 培养基

斜面培养基 (100ml): 0.5g 酵母浸出膏, 1.2g 琼脂粉, 1g 甘油, 0.05g  $H_2HPO_4$ , 0.1g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.05g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ;

种子培养基 (100ml): 0.5g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.45g  $Na_2HPO_4$ , 0.34g  $KH_2PO_4$ , 0.05g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.0g 甘油, 0.2g 胆固醇, 0.2g Triton X-100;

转化培养基 (100ml): 1.0g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.45g  $Na_2HPO_4$ , 0.34g  $KH_2PO_4$ , 0.2g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5g 胆固醇, 2.0g 非离子表面活性剂。

### 微生物培养



微生物在 28 °C、220 rpm、20/250ml 装量条件下有氧活化培养 3 天，取活化种子按 1: 10 比例在装量为 22/250ml 条件下转化培养 7 天。取转化培养液分析。

本发明的转化分析试验报告如下：

### 1. HPLC

取 1ml 转化液用 4ml 甲醇浸泡 2hr。离心后取 0.8ml 上清进行 HPLC 分析。用 Hypersil C18 柱，流动相为甲醇：水(4:1)，流速为 0.7ml/min，检测波长为 254 nm 测得的 ADD 和 4-AD 结果如图 1 所示。

### 2. TLC

底物和产物在 CPS 中的分配用 TLC 分析来确定。TLC 在 Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) 高效薄层层析板上进行。氯仿：乙醚(1:3) 为展层剂，磷钼酸溶液中浸泡、烘干，加热显色，底物和产物 (ADD、4-AD) 可分开。ADD、4-AD、胆固醇的 R<sub>f</sub> 值分别为 0.42, 0.47, 0.67。

### 3. 浊点测定

浊点测定采用目测法观察溶液变浑浊时的温度。缓慢升高溶液温度，记下溶液变混浊时的温度，然后缓慢降低溶液温度，记下溶液澄清时的温度。取两者的平均值作为浊点。

### 4. 增溶测定

按 Triton X-100 和 Triton X-114 的不同比例配制表面活性剂浓度为 2% 的过饱和 ADD 溶液。溶液置具塞玻璃容器，在 220 rpm、28 °C 的条件下震荡 72 hr。膜滤（膜孔径为 20 μm，上海医药工业研究院生产）后用 HPLC 进行 ADD 的定量分析。

## 结果与分析

### (1) 非离子表面活性剂筛选

选择合适的介质进行微生物转化，介质生物相容性或对微生物潜在的毒性是筛选转化介质的前提。介质的潜在毒性可用微生物在含表面活性剂的转化介质转化产生 ADD 的最终产物浓度来表征。图 2 是不同表面活性剂溶液的转化结果。

在高表面活性剂浓度下，只有 Triton X-114 在微生物转化条件下形成能 CPS，其 ADD 的最终产物浓度最高。和 Triton X-114 同一系列的表面活性剂 (Triton X-100) 不具有生物相容性。说明浊点系统



是使表面活性剂的生物相容性得到改善的原因。

## (2) CPS 生物相容性和提高生物利用度的机理

浊点系统发生相分离后, 直接在稀相和凝聚层相加入油溶性染料 (苏丹黑 B) 染色后在显微镜下观察, 结果如图 3 所示。图 3 为 CPS 稀相和凝聚层相的显微观察。在稀相, 小的表面活性剂液滴或胶束因染有染料而显黑色。这是水包油微观乳浊液。在凝聚层相, 形成油包水的微观乳浊液。黑色的背景表示连续的表面活性剂相, 它相当于底物的储藏库和产物的萃取剂。在连续的表面活性剂相中存在大的水泡, 这为细胞提供了水环境。它相当于一个微反应器, 使细胞屏蔽于表面活性剂而免受其毒害作用。细胞在表面活性剂介质中的生物相容性得到改善。在凝聚层相的水泡中有同 CPS 的稀相类似的结构, 存在水包油微观乳浊液。物质交换可发生于表面活性剂液滴之间、水泡之间、连续相和非连续相之间等相界面处。液滴的聚并更加快了物质交换。这使在水中溶解度很小的疏水性化合物的生物利用度得到提高。

通过 TLC 分析, 底物和产物在 CPS 中的分配如图 4 所示。图 4 为浊点系统中底物、产物的分配。底物基本上浓缩于凝集层相。凝集层相对底物优良的溶解能力有利于底物的溶解。ADD 和底物相似也分配于凝集层相。细胞在两相的分配采用血球计数法 (hemocytometer method) 测定。其凝聚层相和稀相的分配系数大概为 10, 表明 *Mycobacterium* sp. 的表面是疏水的。这和文献报道称 *Mycobacterium* 是所谓的疏水性微生物一致。

## (3) 强化 CPS 的增溶能力

### 混和系统的浊点

如图 2 所示, 只有 Triton X-114 的胶束溶液, 其浊点低于微生物转化的培养温度而形成两相表现出良好的生物相容性。表面活性剂溶液的浊点和增溶能力可通过添加不同表面活性剂互配形成混和表面活性剂胶束溶液来调节。为了强化 CPS 的增溶能力, 选用 Triton X-100 形成混和表面活性剂胶束溶液。如图 5 所示, 图 5 为混合系统的浊点。当 Triton X-100 所占的质量分率高于 20% 时, 系统的浊点高



于微生物的转化培养温度(28°C)。转化培养基中的主要成分对系统的浊点影响都很小。微生物转化产物 ADD 能明显地降低混和系统的浊点,有可能使混和系统的浊点降低到培养温度以下,混和系统由一相变成两相。

#### 混和系统的增溶能力

混和表面活性剂胶束溶液对 ADD 的增溶能力随 Triton X-114 的质量分率的变化如图 6 所示。图 6 为混和表面活性剂系统的增溶能力。从纯表面活性剂溶液的增溶能力可以看出 Triton X-100 的增溶能力优于 Triton X-114。当 Triton X-114 的质量分率低于 50% 时,混和系统的增溶能力随 Triton X-114 含量的增加而降低。但在 Triton X-114 的质量分率达到 70% 时,混和系统对 ADD 的增溶能力出现最大值。如图 3 所示,在 CPS 中,凝聚层相中表面活性剂的存在形式完全不同于表面活性剂胶束溶液中的胶束结构。这表明表面活性剂胶束溶液的增溶能力强烈地受浊点影响。由图 5 可知,底物和产物 ADD 在 CPS 中的两相有相同的分配规律。由 ADD 的增溶数据,我们可以推断底物也应该具有相似的增溶规律。

#### 混和系统的微生物转化

经微生物转化 7 天后具有不同 Triton X-114 的质量分率的混和转化系统的分相行为和 ADD 的产率如图 7 所示。图 7 为相分离的产物随混和系统中表面活性剂质量分率的变化。只有 Triton X-100 的质量分率低于 50% 时相分离才会发生。ADD 的最终产物浓度不但比纯 Triton X-100 系统的高而且比纯 Triton X-114 系统的高。ADD 的最终产物浓度随 Triton X-114 质量分率的变化与系统对 ADD 的增溶结果具有类似的变化趋势,且都在 Triton X-114 质量分率为 70% 时出现最大值。混和系统中高 ADD 产率可归因于系统中表面活性剂的增溶能力,它强化了底物的溶解,增加了其生物利用度。同时萃取了产物,解除了产物的抑制。

本发明在 Triton X-100 和 Triton X-114 组成的 CPS 实现了胆固醇边链切除生成甾体药物的重要中间体 ADD 的微生物转化。在这一系统中,形成了油包水和水包油的微观乳浊液。表面活性剂液滴具有



增溶能力，充当着底物的储藏库和产物的萃取剂。强化了底物的生物利用度，排除了产物的抑制。连续的表面活性剂中存在水泡，相当于一个微反应器，能使微生物免受表面活性剂的毒害作用。而且，CPS的增溶能力可由混合表面活性剂来调节。所有这些表明，CPS是介质工程中有前途的方法。

### 附图说明

图-1 ADD 和 4-AD 的 HPLC 谱图

图 2 在不同表面活性剂转化介质中 ADD 的浓度

图 3 CPS 稀相和凝聚层相的显微观察

A. 凝聚层相，油/水乳浊液， $\times 40$  倍。

B. 凝聚层相中的水泡，水/油乳浊液， $\times 600$  倍

C. 稀相，水/油乳浊液， $\times 600$  倍

图 4 浊点系统中底物、产物的分配

1. 标准品；

2. 稀相；

3. 凝聚层相

图 5 混和系统的浊点

100ml: 2.0g 非离子表面活性剂( $\square$ ); 1.0g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.45g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.34g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.0g 非离子表面活性剂( $\diamond$ ); 1.0g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.45g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.34g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1g 胆固醇, 2.0g 非离子表面活性剂( $\triangle$ ); 1.0g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.45g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.34g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1g ADD, 2.0g 非离子表面活性剂(O).

图 6 混和表面活性剂系统的增溶能力

图 7 相分离和产物随混和系统中表面活性剂质量分率的变化



## 具体实施方式

### 实施例 1

#### 微生物转化

微生物菌种 *Mycobacterium* sp. NRRL B 3683 它能实现胆固醇的变链切除, 生成产物 ADD 和 4-AD, 其比例为 10:1。

#### 培养基

斜面培养基 (100ml): 0.5g 酵母浸出膏, 1.2g 琼脂粉, 1g 甘油, 0.05g  $\text{H}_2\text{HPO}_4$ , 0.1g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.05g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ;

种子培养基 (100ml): 0.5g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.45g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.34g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.0g 甘油, 0.2g 胆固醇, 0.2g Triton X-100;

转化培养基 (100ml): 1.0g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.45g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.34g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.45g 胆固醇, 10.0g 混合 Triton X-100 和 Triton X-114 (1: 1)

#### 微生物培养

微生物在 28 °C、220 rpm、20/250ml 装量条件下有氧活化培养 3 天, 取活化种子按 1: 10 比例在装量为 22/250ml 条件下转化培养 7 天。取转化培养液分析。

#### 结果

ADD 和 4-AD (10: 1) 的浓度为 10g/L, 转化率为 93% (摩尔转化率)。

### 实施例 2

#### 微生物转化

微生物菌种 *Mycobacterium* sp. NRRL B 3683 , 它能实现胆固醇的变链切除, 生成产物 ADD 和 4-AD, 其比例为 10:1。

#### 培养基

斜面培养基 (100ml): 0.5g 酵母浸出膏, 1.2g 琼脂粉, 1g 甘油, 0.05g  $\text{H}_2\text{HPO}_4$ , 0.1g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.05g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ;



种子培养基 (100ml): 0.5g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.45g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.34g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.0g 甘油, 0.2g 混合植物甾醇, 0.2g Triton X-100;

转化培养基 (100ml): 1.0g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.45g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.34g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.0g 混合植物甾醇, 10.0g 混合 Triton X-100 和 Triton X-114 (1: 1)

#### 微生物培养

微生物在 28 °C、220 rpm、20/250ml 装量条件下有氧化活化培养 3 天, 取活化种子按 1: 10 比例在装量为 22/250ml 条件下转化培养 7 天。取转化培养液分析。

#### 结果

ADD 和 4-AD (10: 1) 的浓度为 8.2g/L, 转化率为 76% (摩尔转化率)。

### 实施例 3

#### 微生物转化

微生物菌种 *Mycobacterium* sp. NRRL B 3683, 它能实现胆固醇的变链切除, 生成产物 ADD 和 4-AD, 其比例为 10:1。

#### 培养基

斜面培养基 (100ml): 0.5g 酵母浸出膏, 1.2g 琼脂粉, 1g 甘油, 0.05g  $\text{H}_2\text{HPO}_4$ , 0.1g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.05g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;

种子培养基 (100ml): 0.5g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.45g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.34g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.0g 甘油, 0.2g 胆固醇, 0.2g Triton X-100;

转化培养基 (100ml): 1.0g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.45g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.34g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.0g 胆固醇, 10.0g 混合 Triton X-114 8ml。

#### 微生物培养

微生物在 28 °C、220 rpm、20/250ml 装量条件下有氧化活化培养 3 天, 取活化种子按 1: 10 比例在装量为 22/250ml 条件下转化培养 7



天。取转化培养液分析。

结果

ADD 和 4-AD (10: 1) 的浓度为 6.45g/L, 转化率为 60% (摩尔转化率)。



## 说明书附图

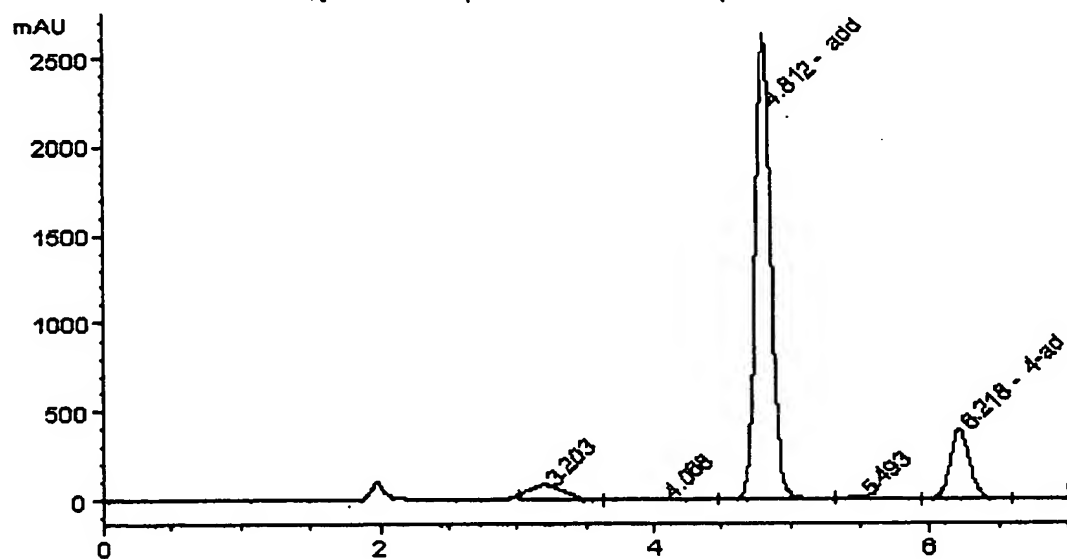


图 1

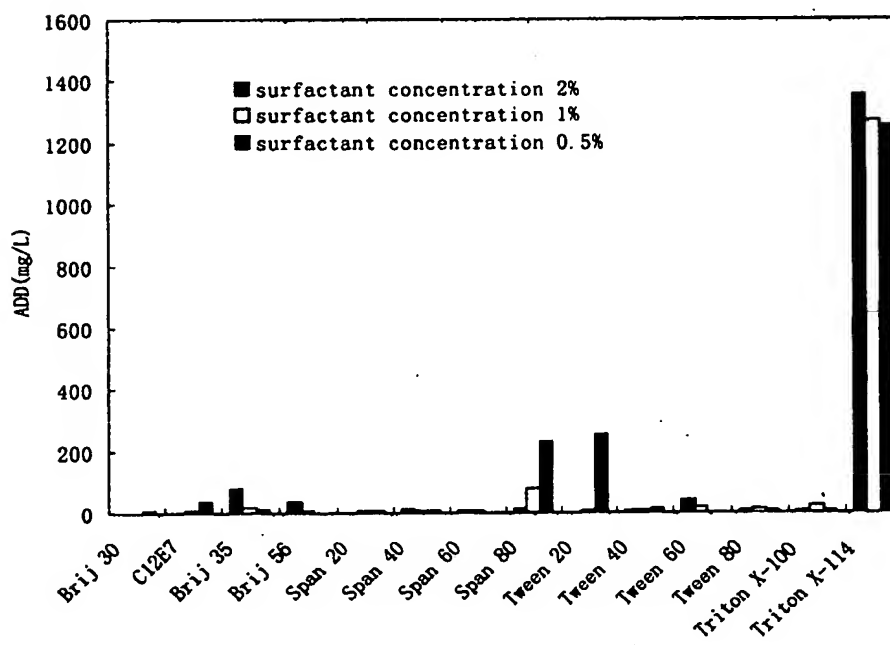


图 2





A



B



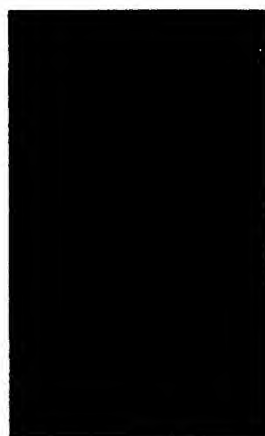
C

图 3

胆固醇

4-AD

ADD



1 2 3

图 4

BEST AVAILABLE COPY



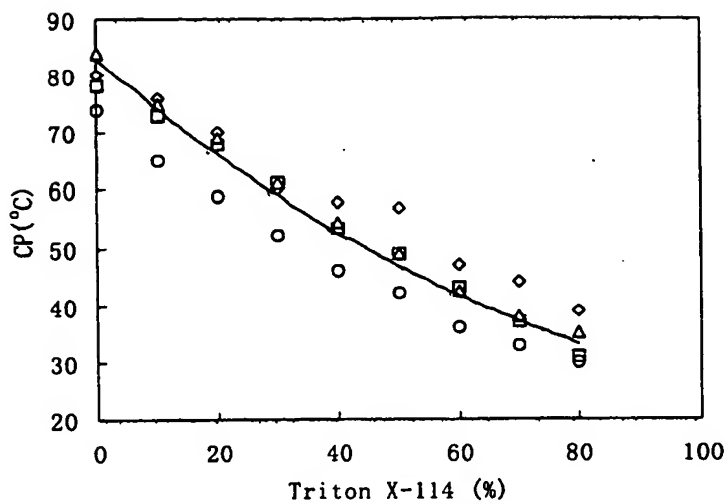


图 5

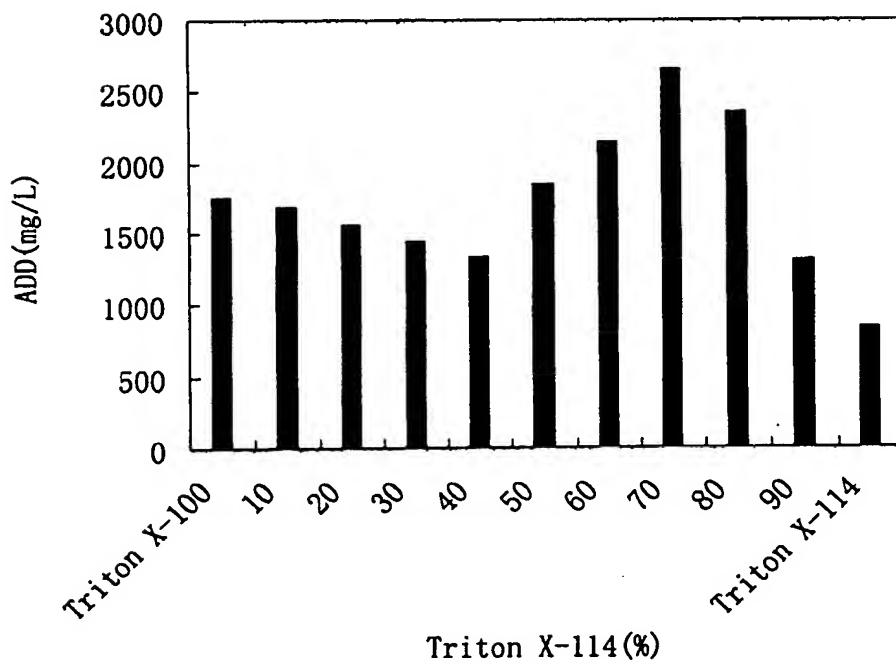


图 6



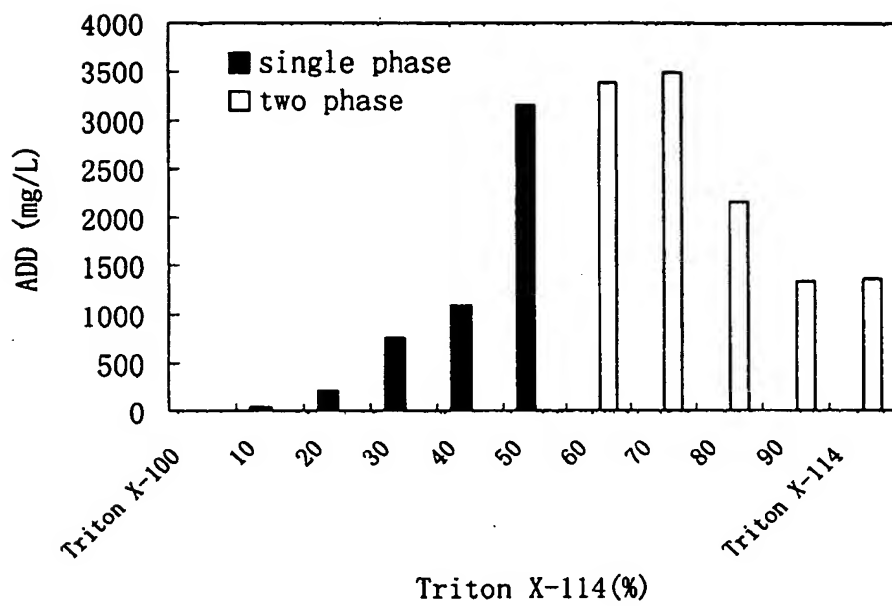


图 7

BEST AVAILABLE COPY